

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655065

研究課題名(和文)イルカはどのように水銀を解毒しているのか？

研究課題名(英文)How does dolphin detoxify mercury?

研究代表者

阿草 哲郎 (Agusa, Tetsuro)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・特任助教

研究者番号：50403853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：イルカやアザラシは肝臓にHgを高蓄積している。これら海棲高等動物の肝臓ではHgSeが形成され、Hgの毒性が解毒されている。しかし、HgSe形成のメカニズムは不明である。本研究では、海棲高等動物におけるHgの無毒化メカニズムを解明するため、HgSe形成のカギとなるHg結合タンパクの同定を試みた。

キタオットセイの肝臓サイトソルを用い、陰イオン交換及びサイズ交換クロマトグラフィーによってタンパクを分離させた。この中でHgを含むフラクションをICP-MSで確認し、電気泳動にかけ、染色したところ、サイズの異なる4つのバンドが確認できた。これらタンパクが、Hgの解毒に重要な働きをするものと推察された。

研究成果の概要(英文)：Higher trophic marine animals accumulate a large amount of Hg in the liver. Most of Hg exists as tiemannite (HgSe) in those mammals. This compound is assumed to be an inert end product of the Hg detoxification process. However, it is still unknown the mechanism of HgSe formation. To understand the detoxification process of Hg, we investigated Hg binding proteins in the hepatic cytosol of the higher trophic marine animals.

By the purification of proteins interacted with Hg using an anion exchange and a gel filtration columns and an inductively coupled plasma - mass spectrometer (ICP-MS), four proteins with the molecular weight around 100 kDa and 40 kDa were obtained in the cytosol fraction of the northern fur seal (*Callorhinus ursinus*). The purified proteins may play a significant role in the formation of Hg-Se complex in the hepatic cytosol.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：水銀 セレン 解毒作用 海棲高等動物 環境化学 環境毒性学 分析化学 メタロミクス

## 1. 研究開始当初の背景

野生生物の中には様々な微量元素(重金属)を特異的に蓄積している種が存在する。長い寿命を持ち、海洋生態系の高次に位置するイルカやアザラシ等の海棲哺乳類、アホウドリ等の海鳥類は、餌となる魚から相当量のメチル水銀(MeHg)を取り込むため、体内、とくに肝臓に水銀(Hg)を高蓄積している。これら海棲高等動物の肝臓中Hgのほとんどは脱メチル化され、無機Hg(IHg)に変換されており、セレン(Se)と等モルで蓄積していることがこれまでの研究で明らかにされている。我々の研究グループも、これまでに鯨類、鰐脚類、海鳥類を対象にHgの蓄積特性について精力的に研究を展開しており、これら海棲高等動物の肝臓において、HgとSeのモル比が1:1であること、また実際にHgSeの鉱物が存在することを明らかにしてきた。以上のことから、海棲高等動物の肝臓において、餌から取り込んだMeHgは脱メチル化され、Seと等モルで結合し、生物学的に不活性な形態(つまり、HgSe)となることでHgの毒性が解毒されていると推察される。

しかしながら、MeHgの脱メチル化やHgSe形成のメカニズムは不明である。我々はまずHgSe形成に着目し、海棲高等動物の肝臓サイトゾル中のHgの存在形態を調査した。その結果、高分子フラクションにおいて、HgとSeの濃度に有意な正の相関がみられ、またHg濃度の増加に伴い、Hg:Seのモル比が1:1に近づくことを世界で初めて明らかにした。このことから、HgSeが形成される前段階として、サイトゾルの高分子フラクション中のタンパクとHgおよびSeが複合体を形成していると考えられた。しかしながら、この高分子タンパクの同定およびその機能については未だ不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、海棲高等動物におけるHgの無毒化メカニズムを解明するため、HgSe形成のカギとなるHgおよびSe結合タンパクを同定す

ることである。

## 3. 研究の方法

試料として、愛媛大学沿岸環境科学研究センターの生物環境試料バンク(es-BANK)に-80で保存したイシイルカ、キタオットセイ、クロアシアホウドリの肝臓を用いた。残念ながら、イシイルカの肝臓試料については実験に利用できるほど十分な量がなかったため、その一連の実験を途中で断念した。液体窒素で凍結粉碎した肝臓試料をバッファーとともにホモジナイズした後、低温超遠心分離機でサイトゾル、マイクロソーム、リソソーム・ミトコンドリア・核のフラクションに分離した。

このうち、本研究ではサイトゾルを用い、まずタンパク濃度をbicinchoninic acid(BCA)法にて測定した。この濃度を元にタンパク量を揃えた後、二次元電気泳動によってタンパクを分離し、クマシー染色した。これによって、得られたスポットの数・濃淡でタンパク発現プロファイルを解析した。また、一部ゲルを切り出し、Hg濃度を誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)で分析した。

しかし、先の方法ではHgの検出が非常に難しかった。そこで、Hgが実際に結合しているタンパクを同定するため、キタオットセイの肝臓サイトゾルを用い、サイズ交換クロマトグラフィーによって分離したフラクションのHgをICP-MSで測定した。得られたHg結合タンパクのフラクションをさらに精製するため、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ交換クロマトグラフィーで分離し、ICP-MSでHgを測定した。得られたHg含有フラクションを、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分離し、クマシー染色をおこなった。

## 4. 研究成果

キタオットセイ、クロアシアホウドリの肝臓サイトゾルに含まれるタンパクを二次元電気泳動で分離した。その結果、いくつか興味深いタンパクの発現プロファイルが認められた。すなわち、同一

種内でも、Hg 濃度の高い個体と低い個体とでスポットの数・強度が異なった。これらの発現量が異なるタンパクは、Hg の解毒に関与している可能性が示唆された。また、キタオットセイとクロアシアホウドリの種間においても大きな差がみられるスポットがいくつか確認することができた。

Hg が実際に結合しているタンパクの同定するため、一部のゲルを切り出し、Hg 濃度を測定したところ、有意な Hg の検出はできなかった。そこで、Hg 濃度が高かったキタオットセイの肝臓サイトゾルを、サイズ交換クロマトグラフィーで分離し、得られた各フラクションの Hg を測定したところ、高分子量フラクションから高い Hg が検出された。また同じく Se も Hg と同じフラクションから相対的に高い濃度で検出された。このフラクションを、陰イオン交換クロマトグラフィー及びサイズ交換クロマトグラフィーによって精製・溶出させたところ、16.5 分～18 分で溶出してきたフラクションに Hg のピークが検出された。そこで、これらの溶出時間のフラクションを SDS-PAGE にかけて、クマシーで染色した。その結果、約 100kDa 付近に 1 つ、約 40kDa 付近に 3 つ、合計 4 つの異なるサイズのバンドを確認することができた。以上のことから、これら溶出フラクションの中に、Hg 結合に関わる重要なタンパクが 4 つ存在すると推察された。

今後は、上記のアプローチで分離されたタンパクをゲルから抽出した後、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析計 (MALDI-TOF-MS/MS) で処理する。得られたペプチドシーケンスをデータベースと照合しながら、Hg 解毒に関与するタンパクの同定を試みる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

Agusa, T., Kunito, T., Kubota, R., Tanabe, S.,

Iwata, H. (2012) Exposure, metabolism, and toxic effect of arsenic in residents from arsenic-contaminated groundwater areas of southeast Asia, In Kawaguchi, M., Misaki, K., Sato, H., Yokokawa, T., Itai, T., Nguyen, T. M., Ono, J., Tanabe S. (Eds.) International Symposium on Advanced Studies by Young Scientists on Environmental Pollution and Ecotoxicology, TERRAPUB, Tokyo, 125-132.

Agusa, T., Kunito, T., Tue, N.M., Lan, V.T.M., Fujihara, J., Takeshita, H., Minh, T.B., Trang, P.T.K., Takahashi, S., Viet, P.H., Tanabe, S., Iwata, H. (2012) Individual variations in arsenic metabolism in Vietnamese: the association with arsenic exposure and GSTP1 genetic polymorphism. *Metallomics*, 4 (1), 91-100. DOI: 10.1039/C1MT00133G

Soejima, M., Fujimoto, R., Agusa, T., Iwata, H., Fujihara, J., Takeshita, H., Minh, T.B., Trang, P.T.K., Viet, P.H., Nakajima, T., Tanabe, S., Koda, Y. (2012) Genetic variation of FUT2 in a Vietnamese population: identification of two novel Se enzyme-inactivating mutations, *Transfusion*, 52/6, 1268-1275. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03485.x.

Asante, K.A., Agusa, T., Biney, C.A., Agyekum, W.A., Bello, M., Otsuka, M., Itai, T., Takahashi, S., Tanabe, S. (2012) Multi-trace element levels and arsenic speciation in urine of e-waste recycling workers from Agbogbloshie, Accra in Ghana. *Science of the Total Environment* 424, 63-73. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.02.072

Fujimori, T., Takigami, H., Agusa, T., Eguchi, A., Bekki, K., Yoshida, A., Terazono, A., Ballesteros Jr, F.C. (2012) Impact of metals in surface matrices from formal and informal electronic-waste recycling around Metro

Manila, the Philippines, and intra-Asian comparison. *Journal of Hazardous Materials*, 221-222, 139-146. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.04.019

Suzuki, S., Kimura, M., Agusa, T., Rahman, H. (2012) Vanadium accelerates horizontal transfer of tet(M) gene from marine Photobacterium to E. coli FEMS Microbiology Letter, 336(1), 52-56. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02653.x.

Tsugeki, N.K., Agusa, T., Ueda, S., Kuwae, M., Oda, H., Tanabe, S., Tani, Y., Toyoda, K., Wan-lin, W. Urabe. J. (2012) Changes in trophic conditions of Japanese mountain lakes due to increasing amounts of Asian dust. *Ecological Research*, 27(6), 1041-1052. DOI: 10.1007/s11284-012-0984-y

Kuwae, M., Tsugeki, N.K., Agusa, T., Toyoda, K., Yukinori, T., Ueda, S., Tanabe, S., Urabe, J. (2013) Sedimentary records of metal depositions in Japanese alpine lakes for the last 250 years: Recent enrichments of airborne Sb and In in East Asia, *Science of the Total Environment*, 442, 189-197. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.037

Noguchi, T., Itai, T., Tue, N.M., Agusa, T., Ha, N.N., Horai, S., Trang, P.T.K., Viet, P.H., Takahashi, S., Tanabe, S. (2013) Exposure assessment of lead to workers and children in the battery recycling craft village, Dong Mai, Vietnam. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 16(1), 46-51. DOI: 10.1007/s10163-013-0159-0

Agusa, T., Trang, P.T.K., Lan, V.M., Anh, D.H., Tanabe, S., Viet, P.H., Berg, M. (2013) Human exposure to arsenic from drinking water in Vietnam, *Science of the Total Environment*, accepted in 2013/10/13. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.10.039

[学会発表] (計 17 件)

Agusa, T., Kunito, T., Tue, N.M., Lan, V.T.M., Minh, T.B., Trang, P.T.K., Fujihara, J., Takeshita, H., Takahashi, S., Viet, P.H., Tanabe, S., Iwata, H. (2012) Associations of 18 single nucleotide polymorphisms in As [+3 oxidation state] methyltransferase (AS3MT) with As methylation capacity in Vietnamese, The Ottawa 2012 International Symposium on Biochemistry & Biophysics, October 25, Ottawa, Canada, PROGRAM & ABSTRACT BOOK, 114-115. (Invited)

Agusa, T., Kunito, T., Inoue, S., Minh, T.B., Tue, N.M., Ha, N.N., Tu, N.P.C., Trang, P.T.K., Takahashi, S., Tuyen, B.C., Viet, P.H., Iwata, H., Tanabe, S. (2013) Arsenic, manganese and barium contamination in groundwater and their human exposure in Vietnam. Japan-Vietnam Joint Workshop on “Current Challenges for Managing Environmental Issues and Waste Recycling in Northern Vietnam”, Hanoi, Vietnam, 8 January 2013, Abstract book, 14.

Agusa, T., Takigami, H., Eguchi, A., Fujimori, T., Bekki, K., Yoshida, A., Terazono, A., Ballesteros Jr., F.C., Ha, N.N., Ramu, K., Murata, S., Parthasaraty, P., Bulbule, K.A., Takahashi, S., Subramanian, A., Iwata, H., Tanabe, S. (2013) Occupational exposure to trace elements in e-waste recycling workers; case studies from the Philippines and India. Workshop for Knowledge Sharing on E-waste in Thailand (The 9th NIES Workshop on E-Waste), Bangkok, Thailand, 31 January 2013. ページ番号無し (Invited)

Agusa, T., Kunito, T., Inoue, S., Minh, T.B., Tue, N.M., Ha, N.N., Tu, N.P.C., Trang, P.T.K., Fujihara, J., Takeshita, H., Takahashi, S., Tuyen, B.C., Viet, P.H., Iwata, H., Tanabe, S. (2013) Arsenic exposure and susceptibility

in Vietnamese. NIES Arsenic Workshop 2013 ~Seeking ways to reduce the arsenic health hazards from the toxicological standpoint~, Tsukuba, Japan, 10 December 2013, Abstracts, p.12. (Invited)

Agusa, T., Yasugi, S., Iida, A., Ikemoto, T., Anan, Y., Kuiken, T., Osterhaus, A.D.M.E., Tanabe, S., Iwata, H. (2012) Accumulation feature of trace elements in mass-stranded harbor seals (*Phoca vitulina*) in the North Sea coast in 2002. SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) North America 33rd Annual Meeting, Long Beach, California, USA, November 11-15, 2012, Abstract Book, 207-208.

Agusa, T., Kunito, T., Tue, N.M., Lan, V.T.M., Minh, T.B., Trang, P.T.K., Fujihara, J., Takeshita, H., Takahashi, S., Viet, P.H., Tanabe, S., Iwata, H. (2013) Associations of single nucleotide polymorphisms and haplotypes in arsenic [+3 oxidation state] methyltransferase (AS3MT) with arsenic metabolism: A case study in arsenic contaminated areas from Vietnam, The Society of Toxicology (SOT) 52nd Annual Meeting, San Antonio, Texas, USA, March, Abstract 318.

Agusa, T., Komori, H., Soga, Y., Nose, M., Mori, S., Kubota, R., Tanabe, S., Iwata, H. (2013) Identification of Quantitative Trait Loci (QTL) Associated with Inorganic Arsenic Metabolism using Recombinant Inbred Strains of Mice. The XIII International Congress of Toxicology (ICT 2013), Seoul, South Korea, June 30 – July 4, 2013, Abstract Book, 205.

Agusa, T., Yasugi, S., Ikemoto, T., Kunito, T., Baba, N., Tanabe, S., Iwata, H. (2014) Characterization of mercury binding proteins in the liver of northern fur seals (*Callorhinus*

*ursinus*), The Society of Toxicology (SOT) 53rd Annual Meeting, Phoenix, Arizona, USA, March 23 – March 27, Abstract 335.

阿草哲郎, 國頭 恭, Nguyen Minh Tue, Vi Thi Mai Lan, Tu Binh Minh, Pham Thi Kim Trang, 高橋 真, 藤原純子, 竹下治男, Pham Hung Viet, 田辺信介, 岩田久人 (2012) ベトナム人の無機ヒ素メチル化能力と AS3MT の SNPs の関係. 第 23 回日本微量元素学会, 東京都千代田区, 7 月, プログラム・抄録集, 171.

阿草哲郎, 小森浩章, 曾我美子, 宮崎龍彦, 能勢真人, 森 士朗, 久保田領志, 田辺信介, 岩田久人 (2012) ヒ素代謝・排泄に関する感受性遺伝子の探索. 第 21 回環境化学討論会, 松山, 7 月, 講演要旨集 (in CD), 2D-15.

阿草哲郎, 滝上英孝, 藤森 崇, 江口哲史, 戸次加奈江, 吉田 綾, 寺園 淳, Florencio C. Ballesteros Jr., Keshav A. Bulbule, Peethambaram Parthasarathy, 高橋 真, Annamalai Subramanian, 岩田久人, 田辺信介 (2012) インドおよびフィリピンの e-waste リサイクル労働者における微量元素曝露の実態. 第 21 回環境化学討論会, 松山, 7 月, 講演要旨集 (in CD), P-012.

阿草哲郎 (2012) 遺伝子レベルのヒ素代謝機構、人種間での感受性の差. 日本化学会中国四国支部広島地区化学講演会, 東広島, 10 月 15 日. (Invited)

阿草哲郎, Annamalai Subramanian, Peethambaram Parthasarathy, Keshav A. Bulbule, 高橋 真, 岩田久人, 田辺信介 (2012) インドの e-waste リサイクル労働者における微量元素曝露の実態. 第 23 回廃棄物資源循環学会研究発表会, 仙台, 10 月, 研究発表会講演論文集, 589-590.

阿草哲郎, 岩田久人, 國頭 恭, 井上 英, 久保田領志, Karri Ramu, Tu Binh Minh, Nguyen Minh Tue, Nguyen Ngoc Ha, Nguyen

Phuc Cam Tu, 藤原純子, Paromita Charaborty, Chhoun Chamnan, Pham Thi Kim Trang, Alissara Reungsang, Kriengsak Srisuk, 中村 哲, 滝沢 智, 竹下治男, 高橋 真, Annamalai Subramanian, Bui Cach Tuyen, Pham Hung Viet, Touch Seang Tana, 田辺信介 (2012) アジア途上国における地下水のヒ素汚染とヒトへの影響. 第 18 回ヒ素シンポジウム, 宮崎, 11 月, 講演要旨集, 40-41.

阿草哲郎, 小森浩章, 曾我美子, 宮崎龍彦, 能勢真人, 森 士朗, 久保田領志, 田辺信介, 岩田久人 (2013) 組換え近交系マウスを用いたヒ素感受性遺伝子座の同定, 第 24 回日本微量元素学会, 吹田, 6 月, プログラム・抄録集, 103.

阿草哲郎, 平川周作, 渡邊 泉, 池本徳孝, 宇高真行, 金 恩英, Evgeny A. Petrov, Valeriy B. Batoev, 田辺信介, 岩田久人 (2013) バイカルアザラシの微量元素蓄積とその応答遺伝子の探索. 第 22 回環境化学討論会, 府中, 7 月, 講演要旨集(in CD), 1-1B-2-1.

阿草哲郎, 國頭 恭, Nguyen Minh Tue, Vi Thi Mai Lan, Tu Binh Minh, Pham Thi Kim Trang, 藤原純子, 竹下治男, 高橋 真, Pham Hung Viet, 田辺信介, 岩田久人 (2013) ベトナム人における AS3MT 遺伝子の発現量とSNPsの関係. 第 19 回ヒ素シンポジウム, 福岡, 11 月, 講演要旨集, 62-63.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://ecotoxiwata.jp/>

<http://researchmap.jp/read0097650/?lang=japanese>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

阿草哲郎 (Agusa, Tetsuro)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・特任  
助教

研究者番号: 50403853

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号: